

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° d'publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 673 291

②1 N° d'enregistrement national :

91 02575

⑤1 Int Cl⁵ : G 01 N 30/72

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 27.02.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 28.08.92 Bulletin 92/35.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : «INBIOMED INTERNATIONAL»
Société à Responsabilité Limitée — FR et
«TEXINFINE» Société Anonyme — FR.

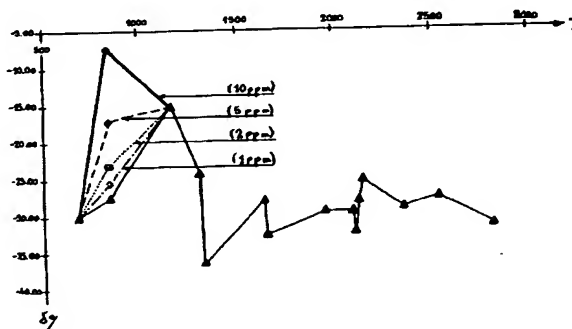
⑦2 Inventeur(s) : Guilluy Roger, Brazier Jean-Louis et
Gutierrez Gilles.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Monnier.

⑤4 Procédé d'authentification de l'origine d'un produit constitué d'un mélange de composés organiques par
marquage isotopique.

⑤7 Ce procédé consiste à procéder à une analyse sépa-
rative par chromatographie gazeuse du mélange de com-
posés organiques constituant le produit, à repérer, par un
couplage chromatographie en phase gazeuse - spectromé-
trie de masse, une ou plusieurs molécules caractéristiques
du mélange, à mesurer en spectrométrie de masse isotopi-
que l'abondance isotopique en ¹³C de cette ou de ces mo-
lécules et enfin à modifier l'enrichissement en ¹³C de cette
ou de ces molécules par addition de molécules similaires
mais dont la richesse en ¹³C a été préalablement augmen-
tée ou diminuée.



FR 2 673 291 - A1



A

La présente invention concerne un procédé d'authentification de l'origine d'un produit constitué d'un mélange de composés organiques par marquage isotopique.

5 La mise sur le marché, après de nombreuses et onéreuses études de certains mélanges de composés organiques, fabriqués industriellement, pose souvent des problèmes au niveau de la commercialisation. En effet, nombreux sont les produits qui sont rapidement victimes d'essais de contrefaçage, spécialement quand ils rencontrent un succès commercial.

10 Il est souvent difficile de lutter contre ces tentatives de contrefaçon, par manque de moyens permettant de différencier avec sécurité le produit d'origine du produit contrefaisant et assurant une authentification du produit d'origine.

Il serait également intéressant de pouvoir repérer, sur un produit fini, quand et dans quelles conditions il a été fabriqué et, pour cela de disposer d'un procédé de marquage fiable et infalsifiable des différents lots de fabrication.

15 On sait d'autre part que l'élément carbone est un élément présent dans toutes les matières organiques et tout spécialement dans toutes les molécules constituant la matière vivante. Le carbone possède deux isotopes naturels stables non radioactifs : le ^{12}C et le ^{13}C et un isotope naturel émetteur de rayonnements bêta, le ^{14}C .

20 L'abondance relative des deux isotopes naturels non radioactifs (environ 98,92 % pour le ^{12}C et environ 1,08 % pour le ^{13}C), varie dans les molécules carbonées d'origine naturelle en fonction d'un certain nombre de paramètres tels que le mode de production : voie végétale ou voie microbiologique.

25 D'autre part, pour une même origine d'espèce (qu'elle soit végétale, microbienne ou autre), différents facteurs environnementaux : géographiques, climatiques...peuvent conduire à des modifications de la répartition isotopique

30 D'infimes différences dans les rapports $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ont donc une signification réelle et peuvent révéler une origine et il est bien évident que la mesure de la variation de ce rapport isotopique, à un très haut niveau de sensibilité, sur un élément présent dans toutes les molécules fait de la connaissance de ce rapport $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ un outil universel de traçage des molécules organiques.

La mesure de ce rapport consiste à compter dans un échantillon de molécules pures le nombre des atomes de l'isotope 13 et le nombre des atomes de l'isotope 12 du carbone.

35 Pour ce faire il faut ramener les molécules complexes à l'état de molécule monocarbonée, le CO_2 dont on peut compter le nombre de chaque isotopomère.

- 2 -

L'analyse isotopique par spectrométrie de masse isotopique ou IRMS (isotope ratio mass spectrometry) permet de faire ce dénombrement. Cette technique consiste à mesurer l'intensité des faisceaux d'ions correspondant aux isotopomères de CO_2 de masse : 44-45 et 46 à l'aide d'un spectromètre de masse à champ fixe et collecteurs multiples (un par faisceau d'ions). Cette mesure d'intensité des faisceaux d'ions permet de calculer le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Les différentes phases de la détermination de ce rapport isotopique sont donc les suivantes :

- transformation de la molécule organique en CO_2
- isolement et purification du CO_2
- mesure du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sur le CO_2 ainsi purifié.

La mesure de ce rapport isotopique a déjà permis de déterminer avec certitude tant l'origine géographique de différents produits naturels que les altérations qui ont pu y être apportées frauduleusement.

C'est ainsi que J. DUNBAR et A.T. Wilson dans Analytical Chemistry, vol 54, 3, Mars 1982, 590-592 ont pu déterminer l'origine géographique de la caféine par analyse des isotopes stables.

Une analyse isotopique du même type (J. Agric. Food Chem. 1987, 35, 758-760) a permis de déceler, dans du jus d'oranges, l'introduction frauduleuse de sucre.

D.A. Krueger et H.W. Krueger dans J. of Agricultural and Food Chemistry, 1985, 33, 323-325 précisent que l'on a souvent essayé de falsifier les extraits de vanille par de la vanilline synthétique dérivée de la lignine. Cette falsification pouvait toutefois être facilement détectée par analyse isotopique, le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du carbone dans la vanilline provenant de la vanille naturelle différant de celui provenant de la vanilline synthétique, dérivée de la lignine ou d'autres sources. Les fraudeurs ont essayé de masquer cette falsification en ajoutant à la vanilline dérivée de la lignine de la vanilline enrichie en ^{13}C , spécialement par utilisation de (méthyl- ^{13}C) vanilline comme source d'excès de ^{13}C .

La présente invention s'est donné pour objet de proposer un procédé permettant d'obtenir une signature isotopique non radioactive, discrète et caractéristique d'un produit constitué d'un mélange de composés organiques.

On utilise pour ce faire les procédés d'analyse isotopique mentionnés ci-avant et spécialement la spectrométrie de masse isotopique qui permet de mesurer les valeurs du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dans des molécules organiques transformées en CO_2 .

La valeur de ce rapport permet, comme on l'a déjà vu, d'authentifier l'origine et les caractéristiques d'une molécule donnée.

L'originalité du procédé selon l'invention consiste à procéder en premier lieu à une analyse séparative du mélange de composés organiques constituant le produit, à repérer une ou plusieurs molécules caractéristiques, à mesurer l'abondance isotopique en ^{13}C de cette ou de ces molécules et enfin à modifier l'enrichissement en ^{13}C de cette ou de ces molécules par addition de la ou des mêmes molécules dont la richesse en ^{13}C a été préalablement augmentée ou diminuée.

Cette modification volontaire par ajout d'une ou de plusieurs molécules enrichies en ^{13}C provoquant une variation voulue de la composition isotopique du mélange de composés organiques constituant un produit et notamment un produit obtenu industriellement permet donc de constituer une signature discrète, infalsifiable, parfaitement inoffensive (à la différence des produits soumis à un marquage radioactif) et qui n'est détectable que par des moyens analytiques spécialisés et spécialement par spectrométrie de masse isotopique.

Cette modification volontaire ne modifie en aucune façon les caractéristiques physiques, chimiques, organoleptiques du produit, non plus que son domaine d'action propre.

La présente invention concerne également les produits industriels revêtus de la signature isotopique appliquée selon le procédé décrit ci-avant.

Les différentes étapes du procédé selon l'invention vont maintenant être décrites.

La première étape consiste à effectuer une analyse séparative du produit que l'on désire revêtir de la signature d'authentification. Cette analyse se fait par tout moyen connu en soi ; selon un mode de réalisation de l'invention on l'effectue par chromatographie en phase gazeuse. On peut ainsi effectuer une évaluation semi-quantitative des composants préférés du marqueur potentiel.

L'examen du chromatogramme permet en effet de repérer les pics les plus caractéristiques d'un ou de plusieurs constituants du mélange et de déterminer ceux qu'il pourrait être indiqué d'enrichir en ^{13}C .

L'étape suivante consiste à déterminer le profil GC-MS (chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse) du produit ; la comparaison des résultats obtenus avec des spectres de masse connus et référencés permet d'identifier les marqueurs probables.

- 4 -

Dans la troisième étape, on détermine le profil isotopique ^{13}C de l'échantillon gazeux contenant du CO_2 issu du produit à marquer par GC-IRMS (chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse isotopique).

5 Cette obtention du profil isotopique permet alors de choisir la ou les molécules susceptibles de servir de marqueurs préférentiels que l'on enrichira en ^{13}C .

Le ou les marqueurs sélectionnés (il peut s'agir de produits du commerce) sont ensuite ajoutés au produit ; une chromatographie gazeuse du produit marqué permet de contrôler l'intégrité du produit marqué par rapport au produit original.

10 Enfin, la détermination du profil isotopique ^{13}C du produit marqué permet de contrôler la signature isotopique.

Le dessin annexé, donné à titre d'exemple, permettra de mieux comprendre l'invention, les caractéristiques qu'elle présente et les avantages qu'elle est susceptible de procurer :

15 Fig. 1 est le chromatogramme en phase gazeuse d'un produit que l'on désire authentifier

Fig. 2 est le profil du produit, obtenu en couplant les résultats de chromatographie gazeuse et de spectrométrie de masse

20 Fig. 3 est le profil isotopique ^{13}C du produit en spectrométrie de masse isotopique

Fig. 4 est le chromatogramme en phase gazeuse du produit marqué ^{13}C

Fig. 5 est le profil isotopique ^{13}C en spectrométrie de masse isotopique du produit marqué obtenu

25 Sur le chromatogramme représenté à la figure 1 on a porté en ordonnées les intensités (I) et en abscisses les temps de rétention (T). On voit sur ce chromatogramme de nombreux pics caractéristiques qui permettent de procéder à une évaluation semi-quantitative des composants préférés pour le marquage et de déterminer parmi les différentes molécules constituant le produit celle ou celles qu'il pourra être indiqué d'enrichir en ^{13}C .

30 La détermination du profil couplé : chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse (GS-MS) est représentée à la figure 2 : les intensités (I) sont portées en ordonnées et les masses atomiques (M) en abscisses. Cette détermination permet, en se référant aux données connues et publiées, de reconnaître parmi d'autres, dans le cas du produit étudié, les molécules suivantes, : (A) acétate de benzyl, (B) citronellol, (C) héliotropine, (D) anthranilate de méthyl, (E) eugénol.

35

- 5 -

Le système GC-MS permettant d'effectuer cette détermination est composé d'un chromatographe gazeux capillaire et d'un détecteur sélectif de masse, tous deux contrôlés par ordinateur.

La colonne est une colonne en silice fondue (30 m de long et 0,25 mm de diamètre intérieur), revêtue d'une phase stationnaire en méthylsilicone (épaisseur : 0,12 μm). La colonne est reliée directement au spectrophotomètre de masse.

Le profil isotopique ^{13}C du produit est ensuite déterminé par couplage de chromatographie gazeuse et de spectrométrie de masse isotopique ; les résultats sont rassemblés à la figure 3 où sont portées, en ordonnées le rapport (δ ‰) des variations en ^{13}C de l'échantillon étudié par rapport à un échantillon CO_2 de référence et en abscisses les temps de rétention.

Ce profil est déterminé sur un spectromètre VG Isochrom II tel que celui décrit par P.A. Freedeman, E.C.P. Gillyon, E.J. Jumeau dans International Laboratory, 7-8 (1988) 22-29.

Dans cet appareil, les composants du mélange organique constituant le produit sont séparés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire sans dérivation. Une fois passés dans la colonne de chromatographie, ils pénètrent dans une four à combustion CuO porté à 800°C où les composants organiques sont transformés en CO_2 .

Le spectromètre de masse isotopique détermine alors l'enrichissement en ^{13}C de chaque composé par les mesures du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 généré à partir de chaque composé du mélange

Il s'agit d'un spectromètre de masse à champ fixe mesurant l'intensité des ions issus d'un échantillon gazeux contenant du CO_2 , grâce à trois collecteurs indépendants réglés sur les masses : 44 - 45 - 46.

Pour obtenir des mesures exactes, l'abondance en ^{13}C est mesurée par rapport à un échantillon de CO_2 de référence dont l'abondance en ^{13}C est connue avec précision.

Une fois ce choix effectué, (acétate de benzyl par exemple dans le cas représenté aux figures) et le taux d'enrichissement ou d'appauvrissement en ^{13}C déterminé, on ajoute du ^{13}C acétate de benzyl au produit en quantité variable de 1 - 2 - 5 - 10 ppm.

La figure 4 représente le chromatogramme gazeux du produit marqué et l'on constate que la répartition et la forme générale des pics n'a pas varié par rapport aux résultats portés à la figure 1.

- 6 -

Enfin (fig. 5), la mesure, en spectrométrie de masse isotopique, de l'abondance isotopique du produit d'origine marqué au ^{13}C acétate de benzyl permet de contrôler la signature isotopique appliquée audit produit. Cette mesure est exprimée en $\delta^\circ/100$ comme dans la figure 3 et constitue la signature isotopique du produit.

On voit à la figure 5 les résultats différents obtenus en faisant varier la quantité de marqueur ^{13}C (1 ppm, 2 ppm, 5 ppm et 10 ppm).

La sensibilité du dosage est telle que, pour certains composés à l'échelle de 10 ppm, il est possible de réaliser 20 marquages différents. La sélection de trois composants permettrait alors d'assurer 8000 références. Il convient de noter que, pour un analyste non informé exactement du choix et de la dose des marqueurs, il est impossible d'identifier les éléments marqués par chromatographie, même si celle-ci est suivie d'une spectrographie de masse.

La même source de marquage peut bien entendu être employée pour plusieurs produits industriels.

Il est bien évident que, sans sortir du cadre de l'invention, la transformation du ou des composés organiques en CO_2 peut se faire par tout processus autre que la combustion, et notamment par réaction chimique, biochimique, enzymatique.

Quand le produit à authentifier se présente directement sous forme de CO_2 , le processus analytique débute par une étape d'isolement-purification et le CO_2 passe directement dans le spectromètre de masse isotopique.

Il peut par exemple s'agir de l'air expiré par un être vivant.

L'échantillon gazeux peut aussi provenir d'effluents ou de résidus atmosphériques de réacteurs chimiques ou biotechnologiques dont un constituant de réaction est transformé en CO_2 .

De même un substrat peut être métabolisé par un système enzymatique de telle sorte que l'un des atomes de carbone soit transformé en CO_2 .

Dans tous ces cas, on peut alors modifier, par addition d'un marqueur comme mentionné plus haut, l'enrichissement naturel en ^{13}C du substrat sur ce site carboné.

La présente invention permet d'agir sur de nombreux marqueurs par enrichissement ou appauvrissement en ^{13}C et établir ainsi une "carte de visite" du produit ou du lot de produit à étudier.

Le procédé selon l'invention trouve de nombreuses applications tant dans le marquage de lots de produits industriels, que dans le contrôle ou le diagnostic de processus chimiques ou biochimiques se déroulant dans des systèmes in vivo, in vitro, ex vivo ou synthétiques appartenant aux règnes animal, végétal ou minéral.

- 7 -

On peut citer, par exemple, le traçage, avec des abondances très faibles en ^{13}C et sur des échantillons très petits, des acides aminés par réaction avec la ninhydrine, suivi d'une mesure de l'enrichissement du CO_2 résultant de la réaction et d'une modification volontaire de la teneur en ^{13}C par introduction d'un
5 marqueur dans le substrat.

Dans le cas d'air expiré par un être vivant, il est possible de suivre l'évolution d'un substrat marqué au ^{13}C et dont le site marqué est oxydé in vivo sous forme de CO_2 .

REVENDICATIONS

1 - Procédé d'authentification de l'origine d'un produit constitué d'un mélange de composés organiques par marquage isotopique caractérisé en ce qu'il consiste à procéder à une analyse séparative du mélange de composés organiques constituant le produit, à repérer une ou plusieurs molécules caractéristiques du mélange, à mesurer l'abondance isotopique en ^{13}C de cette ou de ces molécules et enfin à modifier l'enrichissement en ^{13}C de cette ou de ces molécules par addition de molécules similaires mais dont la richesse en ^{13}C a été préalablement augmentée ou diminuée.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'analyse séparative du mélange de composés organiques constituant le produit est effectuée en chromatographie gazeuse.

3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les molécules caractéristiques sont repérées par un couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse du produit.

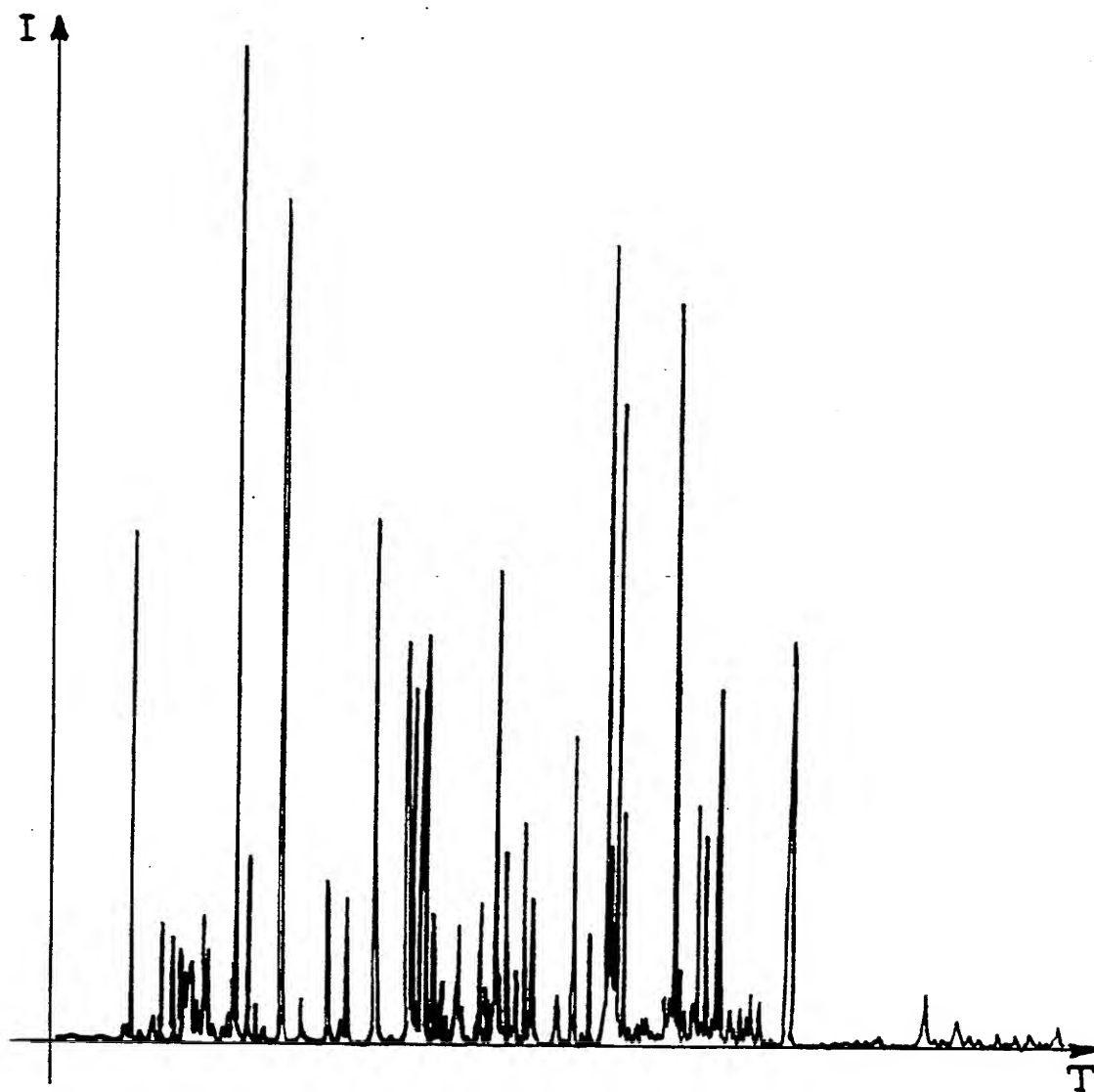
4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la mesure de l'abondance isotopique en ^{13}C est effectuée par spectrométrie de masse isotopique sur les ions issus d'un échantillon gazeux contenant du CO_2 .

5 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que la mesure de l'abondance isotopique en ^{13}C est effectuée sur du CO_2 résultant de la combustion de la ou des molécules organiques.

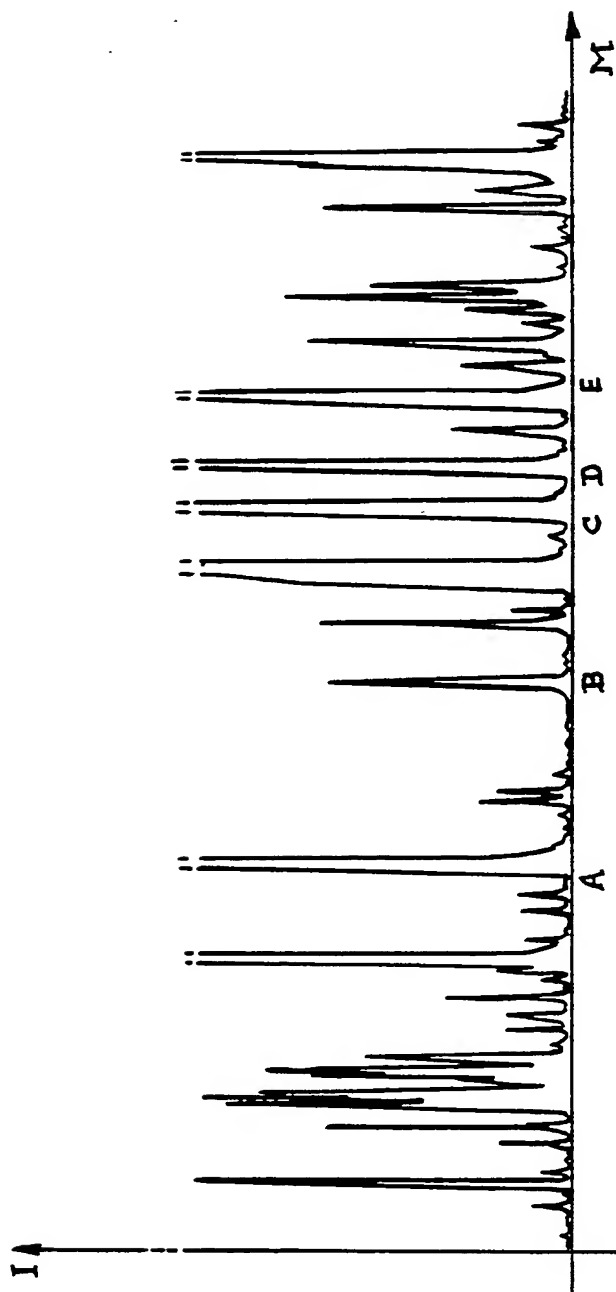
6 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la mesure de l'abondance isotopique en ^{13}C est effectuée sur du CO_2 résultant d'une transformation chimique, biochimique ou enzymatique de la ou des molécules organiques.

7 - Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 à l'authentification d'un produit industriel

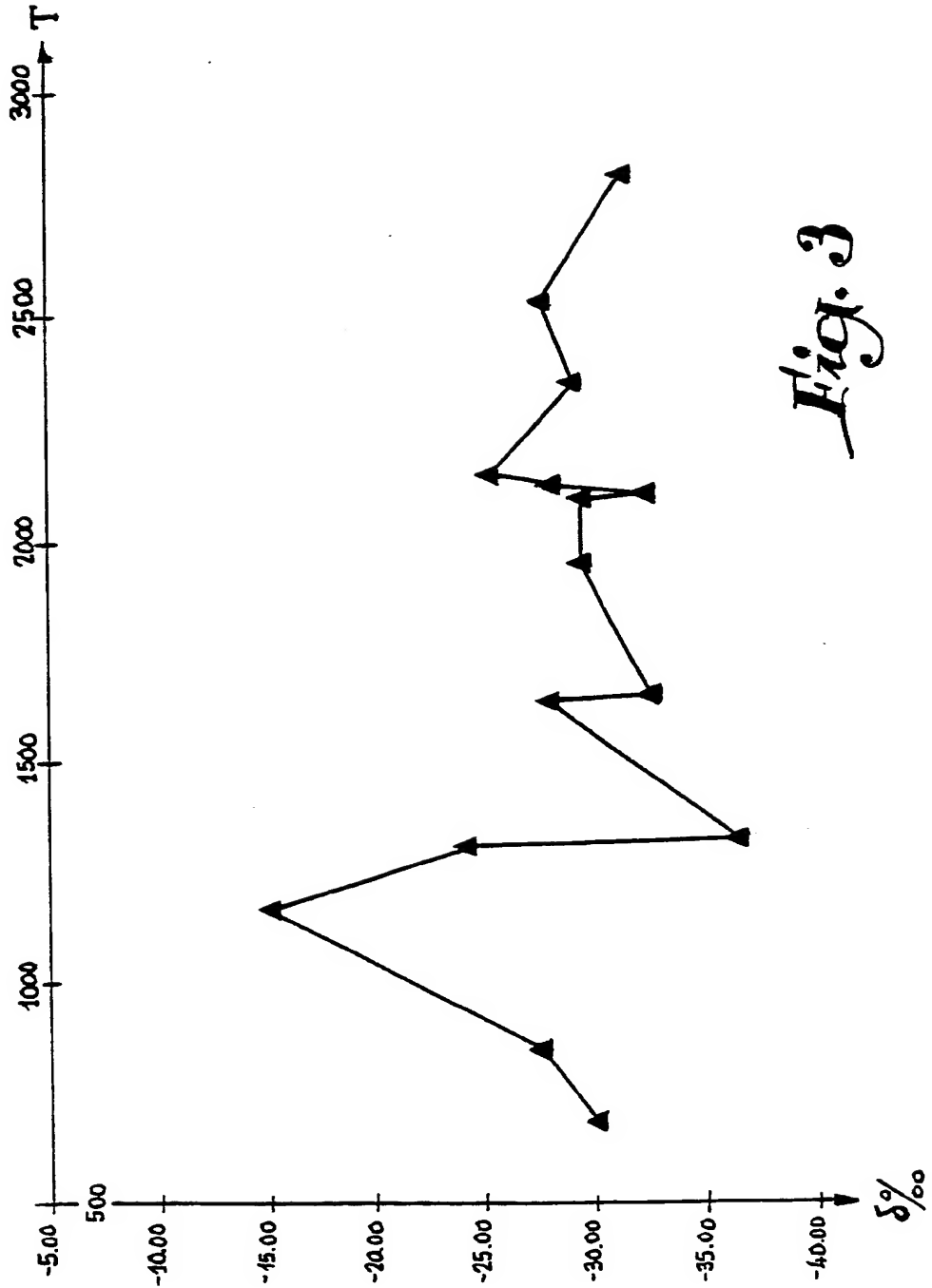
8 - Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 au contrôle des réactions chimiques, biochimiques ou enzymatiques se déroulant dans des systèmes vivants.

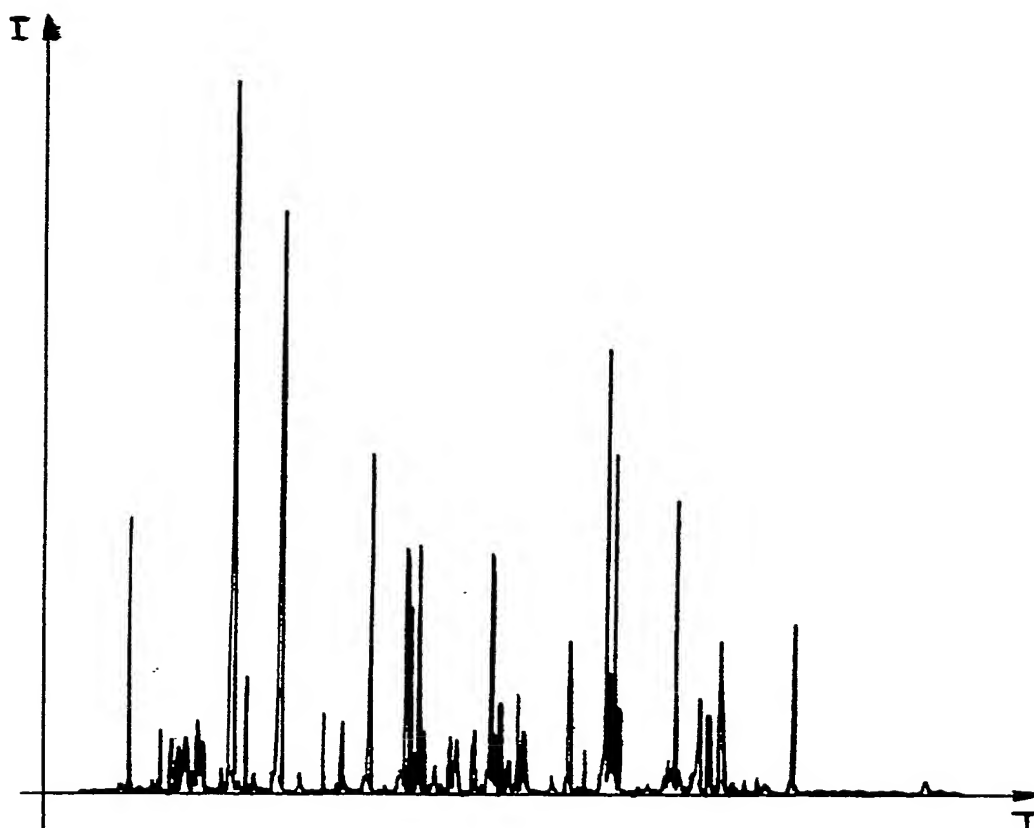
$1/5$ *Fig. 1*

2/5

*Fig. 2*

3/5



$4/5$ *Fig. 4*

5/5

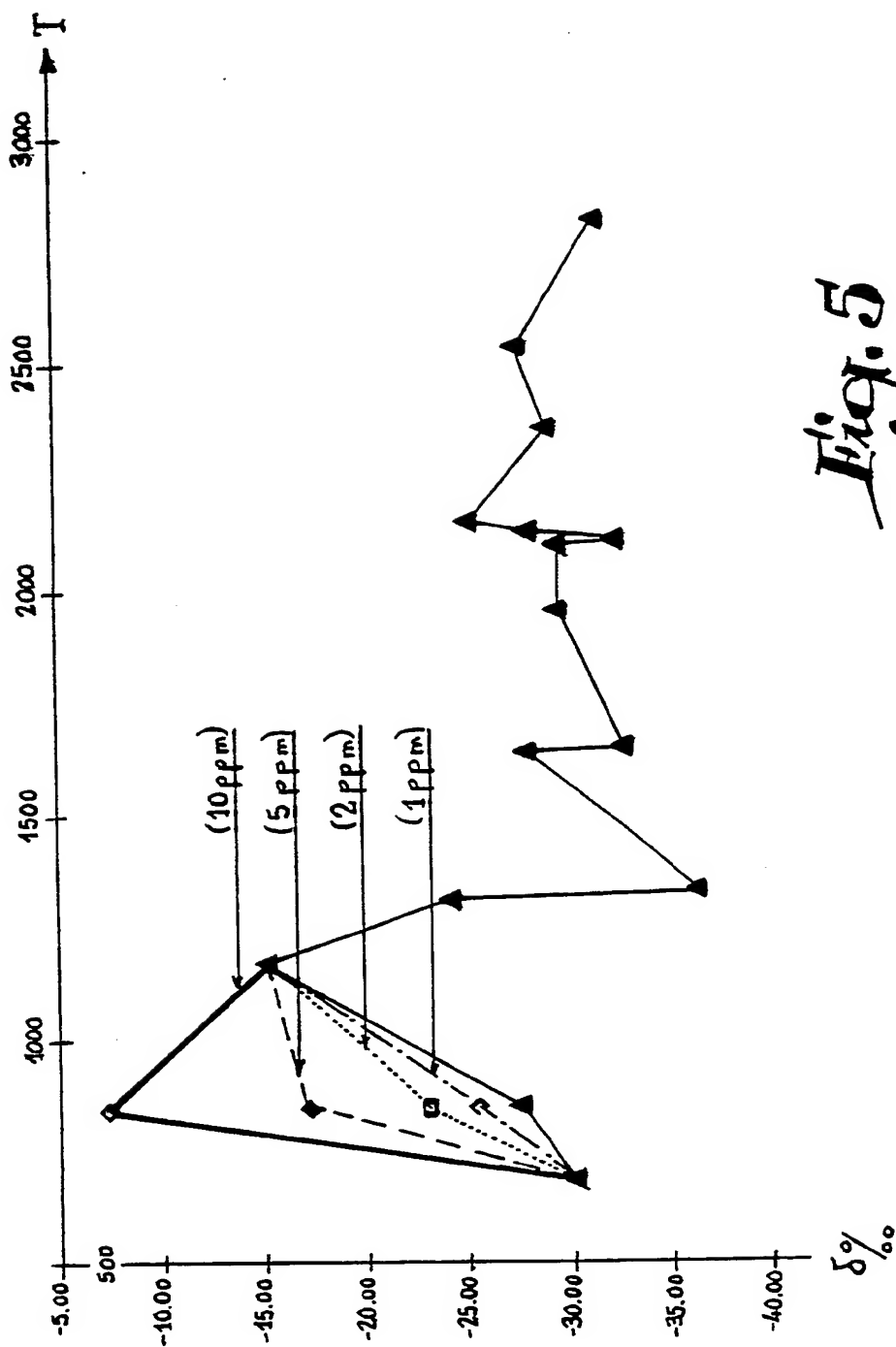


Fig. 5

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9102575
FA 454069
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-8909486 (INDIANA UNIV. FOUNDATION) * abrégé * * page 2, ligne 10 - page 3, ligne 23 * * page 5, ligne 29 - page 6, ligne 23 * * page 10, lignes 1 - 20 * * figures 1, 7a-b *	1-8
D,X	International Laboratory vol. 7-8, 1988, Green Farms, Conn., US pages 22 - 29; FREEDMAN ET AL.: "Design and Application of a new Instrument..." * page 22, colonne 1, ligne 1 - page 24, colonne 1, ligne 24; figures 1, 2 * * page 26, colonne 2, ligne 3 - page 29, colonne 2, ligne 7 *	1-5, 7, 8
D,Y	---	6
D,Y	Journal of Agricultural and Food Chemistry vol. 33, no. 3, mai 1985, Washington, DC, US pages 323 - 325; D.A. KRUEGER ET AL.: "Detection of fraudulent vanillin labeled..." * le document en entier *	6
D,A	---	1-4, 7
Y	EP-A-0306333 (VG INSTRUMENTS GROUP LTD.) * colonne 6, ligne 56 - colonne 7, ligne 22; figure 2 * * colonne 7, ligne 60 - colonne 8, ligne 28 *	1-5, 7
D,Y	Analytical Chemistry vol. 54, no. 3, mars 1982, Washington, DC, US. pages 590 - 592; J. DUNBAR ET AL.: "Determination of geographic origin of caféine..." * le document en entier *	1-5, 7

	-/--	
Date d'achèvement de la recherche 30 OCTOBRE 1991		Examinateur MOUTARD P.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2673291

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9102575
FA 454069
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY. vol. 9, no. 10, novembre 1990, CAMBRIDGE GB pages 331 - 337; M. BJOROY ET AL.: "Stable carbon isotope ratio analysis..." * page 331, colonne 1, ligne 1 - page 333, colonne 2, ligne 15; figure 1 * * page 336, colonne 2, lignes 16 - 30 *</p>	1-8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche:		Examineur
30 OCTOBRE 1991		MOUTARD P.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)